

## PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

AL

(11) Publication number : 09-252674  
 (43) Date of publication of application : 30.09.1997

(51) Int.Cl.

A01H 1/00  
 C12N 5/10  
 C12N 15/09

(21) Application number : 08-070584

(71) Applicant : SAISHIYU JITSUYOU GIJUTSU  
KENKYUSHO:KK

(22) Date of filing : 26.03.1996

(72) Inventor : TAKASAKI TSUYOSHI

**(54) GENE INTRODUCTION METHOD BY MICROBE OF GENUS AGROBACTERIUM AND PRODUCTION METHOD FOR TRANSFORMED PLANT****(57) Abstract:**

**PROBLEM TO BE SOLVED:** To efficiently introduce a gene to the plant of the genus Brassica and to produce transformed plants by pre-culturing the tissue piece of the plant belonging to the genus Brassica, then immersing it in infection liquid containing the microbes of the genus Agrobacterium and culturing it under specified conditions.

**SOLUTION:** After the tissue piece of the plant belonging to the genus Brassica such as Brassica rapa is pre-cultured in a tissue culture medium whose pH is 5.0-6.9, it is immersed in the infection liquid containing the microbe of the genus Agrobacterium, the immersed tissue piece is coexistingly cultured in the tissue culture medium and the gene is introduced to the plant of the genus Brassica. Also, it is preferable to provide a feeder cell in the tissue culture medium and it is preferable to set the values of X, Y and Z so as to satisfy the formula  $82 < X/10 + (Y-19)2 + Z < 145$  [X is the time (minute) to be immersed in the infection liquid; Y is a temperature ( $^{\circ}$ C) at the time of coexisting culture; Z is the period (hour) of the coexisting culture] for producing the transformed plant of the genus Brassica.

**LEGAL STATUS**

[Date of request for examination] 02.05.1996  
 [Date of sending the examiner's decision of rejection] 15.07.1998  
 [Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]  
 [Date of final disposal for application].  
 [Patent number]  
 [Date of registration]  
 [Number of appeal against examiner's decision of rejection]  
 [Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]  
 [Date of extinction of right]

Copyright (C) 1998,2003 Japan Patent Office

BEST AVAILABLE COPY

**GENE INTRODUCTION METHOD BY MICROBE OF GENUS AGROBACTERIUM AND PRODUCTION METHOD FOR TRANSFORMED PLANT**

**Patent number:** JP9252674  
**Publication date:** 1997-09-30  
**Inventor:** TAKASAKI TSUYOSHI  
**Applicant:** SAISHIYU JITSUYOU GIJUTSU KENK  
**Classification:**  
- **international:** A01H1/00; C12N5/10; C12N15/09  
- **european:**  
**Application number:** JP19960070584 19960326  
**Priority number(s):** JP19960070584 19960326

**Report a data error here****Abstract of JP9252674**

**PROBLEM TO BE SOLVED:** To efficiently introduce a gene to the plant of the genus Brassica and to produce transformed plants by pre-culturing the tissue piece of the plant belonging to the genus Brassica, then immersing it in infection liquid containing the microbes of the genus Agrobacterium and culturing it under specified conditions. **SOLUTION:** After the tissue piece of the plant belonging to the genus Brassica such as *Brassica rapa* is pre-cultured in a tissue culture medium whose pH is 5.0-6.9, it is immersed in the infection liquid containing the microbe of the genus Agrobacterium, the immersed tissue piece is coexistingly cultured in the tissue culture medium and the gene is introduced to the plant of the genus Brassica. Also, it is preferable to provide a feeder cell in the tissue culture medium and it is preferable to set the values of X, Y and Z so as to satisfy the formula  $82 < X/10 + (Y-19) < 2 > + Z < 145$  [X is the time (minute) to be immersed in the infection liquid; Y is a temperature (deg.C) at the time of coexisting culture; Z is the period (hour) of the coexisting culture] for producing the transformed plant of the genus Brassica.

---

Data supplied from the **esp@cenet** database - Worldwide

BEST AVAILABLE COPY

AL

(19)日本国特許庁 (JP)

## (12) 公開特許公報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平9-252674

(43)公開日 平成9年(1997)9月30日

(51)Int.Cl. <sup>6</sup>	識別記号	序内整理番号	F I	技術表示箇所
A 01 H 1/00			A 01 H 1/00	A
C 12 N 5/10			C 12 N 5/00	C
15/09		9282-4B	15/00	A

審査請求 有 請求項の数3 O.L (全8頁)

(21)出願番号	特願平8-70584	(71)出願人	595017702 株式会社採種実用技術研究所 宮城県仙台市青葉区南吉成6丁目6番地の 3
(22)出願日	平成8年(1996)3月26日	(72)発明者	高崎 剛志 宮城県仙台市青葉区南吉成6-6-3 株 式会社採種実用技術研究所内
		(74)代理人	弁理士 平木 祐輔 (外1名)

(54)【発明の名称】 アグロバクテリウム属の微生物による遺伝子導入方法及び形質転換植物の作出方法

## (57)【要約】

【解決手段】 ブラシカ属の植物の組織片を組織片培養培地で前培養した後、アグロバクテリウム属の微生物を含む感染液に浸漬し、浸漬後の組織片を前記組織片培養培地で共存培養し、次いで、共存培養後の組織片からカルスを誘導し、得られたカルスを再分化することにより、ブラシカ属の形質転換植物を作出する方法において、組織片培養培地のpHを特定範囲とすること、組織片培養培地にフィーダーセルを添加すること、又は、感染液への浸漬時間、共存培養時の温度、及び共存培養期間の3者を特定の値とすること、を特徴とするブラシカ属の形質転換植物の作出方法。

【効果】 アグロバクテリウム属の微生物を用いて、効率的にブラシカ属の植物に遺伝子を導入し、形質転換植物を作出する方法を提供する。

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 ブラシカ属の植物の組織片を組織片培養培地で前培養した後、アグロバクテリウム属の微生物を含む感染液に浸漬し、浸漬後の組織片を前記組織片培養培地で共存培養することにより、ブラシカ属の植物に遺伝子を導入する方法において、組織片培養培地のpHを5.0~6.9とすることを特徴とするブラシカ属の植物の遺伝子導入方法。

【請求項2】 ブラシカ属の植物の組織片を組織片培養培地で前培養した後、アグロバクテリウム属の微生物を含む感染液に浸漬し、浸漬後の組織片を前記組織片培養培地で共存培養することにより、ブラシカ属の植物に遺伝子を導入する方法において、組織片培養培地がフィーダーセルを含むことを特徴とするブラシカ属の植物の遺伝子導入方法。

【請求項3】 ブラシカ属の植物の組織片を組織片培養培地で前培養した後、アグロバクテリウム属の微生物を含む感染液に浸漬し、浸漬後の組織片を前記組織片培養培地で共存培養し、次いで、共存培養後の組織片からカルスを誘導し、得られたカルスを再分化することにより、ブラシカ属の形質転換植物を作出する方法において、下記の式

$$82 < x / 10 + (y - 19)^2 + z < 145$$

〔但し、xは感染液に浸漬する時間(分)、yは共存培養時の温度(℃)、zは共存培養の期間(時)〕を満たすようにx、y、zの値を設定することを特徴とするブラシカ属の形質転換植物の作出方法。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、アグロバクテリウム属の微生物を用いて、効率的にブラシカ属の植物に遺伝子を導入し、形質転換植物を作出する方法に関する。

## 【0002】

【従来の技術】バイオテクノロジーが急速に進展する中で、組織培養、薬培養、細胞培養などのバイオテクノロジー技術を利用して、多様な特性を有する品種が育成されてきた。更に組換えDNA技術の発達により通常交配不可能な他の生物種の遺伝子を導入することにより、従来期待し得なかった特性を有する品種が育成されている。

【0003】アメリカでは既に、日持ちの良いトマトとしてポリガラクトロナーゼ遺伝子のアンチセンスを導入したトマト(フレバーセーバー)が市場に出回っている。また、BT-Toxinを導入した耐虫性バレイショ、トウモロコシ、除草剤耐性遺伝子を導入したワタ、大豆、ウィルスの外被タンパク質を導入したカボチャが、いずれも食品としての安全性が認可され、実用化の段階にある。

【0004】カナダでは除草剤耐性のナタネが安全評価を終え、実用化の段階にある。これら組換えDNA技術

を利用した作物の商品化は今後ますます進む傾向にある。組換えDNAを利用した品種の作出には優良な遺伝子の単離と植物への遺伝子導入技術が必要とされる。植物への遺伝子導入方法にはアグロバクテリウム法、エレクトロポレーション法、パーティクルガン法などがある。アグロバクテリウム法はナス科、ウリ科の植物では高率で形質転換植物を作出できるが、アブラナ科の植物では成功率が低く、効率的な遺伝子導入技術及び再分化技術の開発が急がれている。特にアブラナ、ハクサイ、カブ、ツケナなどを含むブラシカ・ラバ(Brassica rapa)は組織片からの再分化能が低いため、遺伝子を導入した細胞を個体レベルにまで分化できたという報告は少ない(Radke et al, Plant Cell Rep (1992) 11:499-505, Mukhopadhyay et al, Plant Cell Rep (1992) 11: 506-513, Jun et al. Plant Cell Rep. (1995) 14: 620-625)。

## 【0005】

【発明が解決しようとする課題】本発明の目的は、アグロバクテリウム属の微生物によるブラシカ属の形質転換植物の効率的な作出方法を提供すると共に、組換えDNA技術を利用したブラシカ属の植物の品種作出方法を提供する。

## 【0006】

【課題を解決するための手段】本発明者は、上記課題を解決すべく鋭意検討を重ねた結果、組織片培養培地のpHを特定の値とすること、又は組織片培養培地にフィーダーセルを添加することにより遺伝子導入率が著しく向上することを見出し、また、感染液への浸漬時間、共存培養時の温度、共存培養期間の3つのパラメーターが密接に関連し、これらを特定の値とすることにより、形質転換植物の作出効率が著しく向上することを見出し、これらの知見に基づき本発明を完成した。

【0007】即ち、本発明は、ブラシカ属の植物の組織片を組織片培養培地で前培養した後、アグロバクテリウム属の微生物を含む感染液に浸漬し、浸漬後の組織片を前記組織片培養培地で共存培養することにより、ブラシカ属の植物に遺伝子を導入する方法において、組織片培養培地のpHを5.0~6.9とすることを特徴とするブラシカ属の植物の遺伝子導入方法である。

【0008】また、本発明は、ブラシカ属の植物の組織片を組織片培養培地で前培養した後、アグロバクテリウム属の微生物を含む感染液に浸漬し、浸漬後の組織片を前記組織片培養培地で共存培養することにより、ブラシカ属の植物に遺伝子を導入する方法において、組織片培養培地がフィーダーセルを含むことを特徴とするブラシカ属の植物の遺伝子導入方法である。

【0009】さらに、本発明は、ブラシカ属の植物の組織片を組織片培養培地で前培養した後、アグロバクテリウム属の微生物を含む感染液に浸漬し、浸漬後の組織片を前記組織片培養培地で共存培養し、次いで、共存培養

後の組織片からカルスを誘導し、得られたカルスを再分化することにより、ブラシカ属の形質転換植物を作出する方法において、下記の式

$$82 < x/10 + (y - 19)^2 + z < 145$$

〔但し、xは感染液に浸漬する時間（分）、yは共存培養時の温度（℃）、zは共存培養の期間（時）〕を満たすようにx、y、zの値を設定することを特徴とするブラシカ属の形質転換植物の作出方法である。

【0010】以下、本発明を詳細に説明する。本発明の遺伝子導入方法は、ブラシカ属の植物の組織片を組織片培養培地で前培養した後、アグロバクテリウム属の微生物を含む感染液に浸漬し、浸漬後の組織片を前記組織片培養培地で共存培養することにより、ブラシカ属の植物に遺伝子を導入する。また、本発明の形質転換植物の作出方法は、前記方法により遺伝子を導入した組織片からカルスを誘導し、得られたカルスを再分化することにより、ブラシカ属の形質転換植物を作出する。

【0011】ここで用いるブラシカ属の植物は、ブラシカ属に属する限り、どのような種でもよく、例えば、ブラシカ・ラバ、ブラシカ・オレシア等を用いることができる。これらの種の中でもブラシカ・ラバを好ましい種として例示できる。ブラシカ・ラバに属する植物の中でもハクサイ（*B. rapa* ssp. *pekinensis*）、カブ（*B. rapa* ssp. *rapa*）、ツケナ（*B. rapa* ssp. *chinensis*）を特に好ましい植物として例示できる。好ましい品種としては、ツケナでは、友好菜（カネコ（株））、紅菜苔（（株）サカタのタネ）、おそれ（タキイ種苗（株））、カブでは本紅大丸カブ（渡辺採種場（株））、日野菜カブ（タキイ種苗（株））、聖護院カブ（タキイ種苗（株））、ハクサイでは、ストロングCR（渡辺採種場（株））、郷風（（株）サカタのタネ）等を例示できる。

【0012】前培養に用いる植物の組織片は、遺伝子導入後、個体レベルにまで分化できる能力を有するものであればどのようなものでもよく、例えば、花茎、葉、子葉片、胚軸などを用いることができる。

【0013】組織片培養培地は、植物の組織片の培養に必要な成分、例えば、炭素源、窒素源、無機塩類、固形剤、植物ホルモン等を含むものであればどのようなものでもよい。炭素源としては、例えば、スクロース、グルコース等を用いることができ、無機塩類としては、MS無機塩、B5無機塩等を用いることができ、固形剤としては、寒天、ゲルライト等を用いることができ、植物ホルモンとしては、2, 4-D、α-ナフタレン酢酸（NAA）、ベンジルアデニン（BA）、ゼアチン（Zeatin）等を用いることができる。また、組織片培養培地は、フィーダーセルを含むことが好ましい。フィーダーセルにより、ブラシカ属の植物の遺伝子導入率が向上する。フィーダーセルとしては、例えば、タバコ、トマトのサスペンジョン等を用いることができる。組織片培養

培地中のフィーダーセルの濃度は1.5 ml/90cm<sup>2</sup>シャーレ程度とするのが好ましい。組織片培養培地のpHは、5.0～6.9とするのが好ましく、5.2～5.8とするとのが更に好ましい。培地のpHをこのような範囲とすることにより、ブラシカ属の植物の遺伝子導入率が向上する。前培養時の温度は、植物の組織片に悪影響を及ぼさない範囲であれば特に制限はないが、20～28℃とするのが好ましい。

【0014】用いるアグロバクテリウム属の微生物は、特に制限はないが、アグロバクテリウム・トメファシエンス（*Agrobacterium tumefaciens*）が好ましく、特に、CIB542/A136系統、又はEHA101系統のものが好ましい。アグロバクテリウムEHA101系統は、バイナリーベクターpIG12Hmを有する。このベクターのT-DNA領域を図1に示す。図1が示すように、このベクターはレポーター遺伝子となるGUS遺伝子のほか、選抜マーカー遺伝子となるカナマイシン耐性遺伝子（KmR）及びハイグロマイシン耐性遺伝子（HygR）を有する。感染液中のアグロバクテリウム属の微生物の濃度は、特に制限はないが、1.2×10<sup>8</sup>cells/ml程度が好ましい。

【0015】感染液に植物の組織片を浸漬する時間、共存培養時の温度、及び共存培養の期間は、遺伝子導入率、及びその後の再分化率に大きな影響を与える要素である。遺伝子導入率の向上を図るという観点からは、浸漬時間及び共存培養期間を長くし、共存培養時の温度を高くすることが好ましい。但し、浸漬時間及び共存培養期間を長くし、共存培養時の温度を高くすることにより、遺伝子を導入した組織片の再分化率が低下する。従って、形質転換植物の作出効率を向上させるためには、浸漬時間、培養温度、培養期間を総合的に勘案し、好適な範囲に定める必要がある。具体的には、浸漬時間をx分、培養温度をy℃、培養期間をz時間とした場合に、x、y、zを下式

$$82 < x/10 + (y - 19)^2 + z < 145$$

を満たすように設定するのが好ましく、

98 ≤ x/10 + (y - 19)^2 + z ≤ 113

を満たすように設定するのがより好ましい。浸漬時間、培養温度、培養期間は、上記の式を満たす限り、任意の値をとり得るが、浸漬時間は10～30分とするのが好ましく、培養温度は20～30℃とするのが好ましく、培養期間は24～72時間とするのが好ましい。

【0016】遺伝子を導入した組織片は、カルスを誘導した後、不定芽、シュート等を経由して最終的に個体レベルにまで分化させる。このような再分化は常法に従つて行うことができる。

【0017】

【発明の実施の形態】

【0018】

【実施例】最初に、実施例及び試験例において使用する培地の組成を下記に示す。

【0019】<播種培地>MS無機塩、塩酸ピリミジン: 50 µg/L、ニコチン酸: 50 µg/L、グリシン: 200 µg/L、フィトアガー: 0. 6%、pH 5. 8  
 <組織片培養培地>MS無機塩、ミオイノシトール: 100 mg/L、塩酸チアミン: 1. 3 mg/L、KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>: 200 mg/L、2, 4-D: 1 mg/L、スクロース: 3%、フィトアガー: 0. 6%

【0020】<カルス誘導培地>B5無機塩、B5ビタミン、2, 4-D: 1 mg/L、スクロース: 3%、フィトアガー: 0. 6%、pH 5. 8  
 <不定芽形成培地>B5無機塩、B5ビタミン、BA: 3 mg/L、ゼアチン: 1 mg/L、スクロース: 1%、フィトアガー: 0. 6%、pH 5. 8  
 <不定芽成熟培地>B5無機塩、B5ビタミン、スクロース: 1%、フィトアガー: 0. 6%、pH 5. 8

【0021】<発根培地>B5無機塩、B5ビタミン、スクロース: 1%、フィトアガー: 0. 6%、IBA: 2 mg/L、pH 5. 8  
 <YBE培地>バクトペプトン: 5 g/L、イーストエキストラクト: 1 g/L、ビーフエキストラクト: 5 g/L、MgCl<sub>2</sub>: 0. 5 g/L、スクロース: 5 g/L、バクトアガー: 1. 5%

【0022】〔試験例1〕アグロバクテリウム属の微生物の遺伝子導入率は、この微生物のVir遺伝子発現に大きく依存する。Vir遺伝子の発現は低pH、单糖類の添加、アセトシリンゴン(Acetosyringone)などのフェノール化合物の添加等により更に高められることが知られている。そこで、組織片培養培地のpHを変え、また、

培地に糖、アセトシリンゴン、又はフィーダーセルを加え、遺伝子導入率に与える影響を調べた。

【0023】まず、組織片培養培地のpHを5. 8又は5. 2に調整し、また、培地中にグルコース、アセトンシリンゴン、又はフィーダーセルを添加した。グルコースは培地中の濃度が0. 1 Mに、アセトシリンゴンは培地中の濃度が100 µMになるように添加した。また、フィーダーセルはタバコ(BY-2)を使用し、培地中のフィーダーセルの濃度1. 5 ml/90cmシャレになるようにした。

【0024】次に、コマツナ品種(おそめ)の播種後6-7日目の実生から5-10mmの胚軸を採取し、これを、上記のようにpH及び成分を調整した組織片培養培地に置床し、1日間、前培養した。前培養した後の胚軸は、アグロバクテリウムEHA101(pIG121Hm)を含む感染液に10分間浸漬した。この感染液は、アグロバクテリウムEHA101(pIG121Hm)をYBE液体培地で一晩培養し、培養液の濁度がOD<sub>680</sub> = 1. 0となったものを組織片培養培地で10倍に希釈することにより調製した。感染液に浸漬した胚軸は、前培養した培地に戻し、25°Cで2日間共存培養した。

【0025】バイナリーベクターpIG121HmはGUS遺伝子を有するので、遺伝子導入が起こった場合には、その胚軸はGUS活性が陽性となる。そこで、GUS活性を指標として遺伝子導入が生じたかどうかを判断した。結果を表1に示す。

#### 【0026】

【表1】

pH	Glu	AS	FC	供試数	GUS活性			導入率 % total (%)
					++	+	-	
7.0	-	-	-	100	1	37	72	38 19.5
5.8	-	-	-	100	5	33	72	43 21.0
5.8	+	-	-	100	4	26	70	34 17.0
5.8	-	+	-	100	6	29	65	41 20.5
5.8	-	-	+	100	8	41	51	57 28.5
5.2	-	-	-	100	4	38	58	46 23.0
5.2	+	-	-	100	6	43	51	55 27.5
5.2	-	+	-	100	8	32	60	48 24.0
5.2	-	-	+	100	21	51	28	93 46.5

++ : 胚軸の両端にGUS活性

+ : 胚軸の両端にGUS活性

- : GUS活性なし

+total : 2 × [++数] + [+]数]

Glu : グルコース (+: 添加, -: 無添加)

AS : アセトシリンゴン (+: 添加, -: 無添加)

FC : フィーダーセル (+: 添加, -: 無添加)

導入率(%) = (+total / 200) × 100

【0027】表1が示すように、培地のpHは5. 8よりも5. 2とした方が、遺伝子導入率が相対的に高かった。また、培地へフィーダーセルを添加することによっても遺伝子導入率が向上した。なお、培地への糖の添加は遺伝子導入率に影響を及ぼさなかった。

【0028】〔試験例2〕共存培養の温度・期間、及び感染液への胚軸の浸漬時間を変え、遺伝子導入率に与える影響を調べた。試験例1と同様の胚軸を、フィーダーセル(タバコBY-2)を添加し、pHを5. 2に

調製した組織片培養培地に置床し、1日間前培養した後、試験例1と同様にして調製した感染液に、前培養後の胚軸を10分又は30分浸漬した。浸漬後、胚軸を組織片培養培地に戻し、1~3日共存培養を行った。共存培養時の温度は25°C又は28°Cとした。共存培養後のGUS活性を試験例1と同様に調べた。結果を表2に示す。

#### 【0029】

【表2】

浸漬時間 (分)	培養温度 (℃)	培養期間 (日)	供試数	GUS 活性			導入率 (%)
				++	+	-	
10	25	1	100	0	0	100	0
10	25	2	100	19	50	31	44.0
10	25	3	100	45	35	20	62.5
10	28	1	100	0	0	100	0
10	28	2	100	42	28	30	56.0
10	28	3	100	55	35	10	72.5
30	25	3	100	54	29	17	68.5
30	28	3	100	49	51	0	74.5

【0030】アグロバクテリウムの遺伝子導入率は共存培養温度28℃の方が25℃よりも高い傾向にあった。また、共存培養期間を1日間から3日に延ばすに従つて遺伝子導入率は向上した。感染液への浸漬時間を30分間にすることによって更に遺伝子導入率は向上した。アグロバクテリウム属の微生物の培養は一般に28℃、24時間で行われる。28℃はアグロバクテリウムの増殖に最適温度であると思われる。遺伝子導入率はアグロバクテリウムの増殖率に比例して、増加する傾向にあると考えられる。

【0031】〔試験例3〕試験例2に示すように、感染

液の浸漬時間を30分、共存培養を28℃、3日間することにより、感染率は74.5%まで増加させることができた。しかし、共存培養中のアグロバクテリウム属の微生物の増殖により、胚軸からの再分化率が低下する可能性があり、最終的な形質転換効率は低下するかもしれない。そこで、高い遺伝子導入率を示した6つ感染条件における形質転換植物の作出率を調べた。結果を表3に示す。

【0032】

【表3】

時間 (分)	温度 (℃)	培養期間 (日)	供試数	KmRカレス	KmRシート	GUS+ 植物	式値	作出率 (%)
				SRM	SMM	RIM		
10	25	2	200	31	17	14	6	81
10	25	3	200	53	47	22	12	4.0
30	25	3	200	71	52	18	15	5.0
10	28	2	200(-1)	80	30	19	9	6
10	28	3	200(-29)	61	24	12	7	4
30	28	3	200(-46)	42	16	7	4	2

SRM: 不定芽形成培地

SMM: 不定芽成熟培地

RIM: 発根培地

【0033】共存培養温度を25℃とした場合は、アグロバクテリウム属の微生物の増殖は胚軸からの再分化に影響を及ぼさなかった。遺伝子導入率の増加に従い、得られるカナマイシン耐性カレスとシート数は増加し、感染液への浸漬時間30分、共存培養期間3日の場合には、5%の形質転換体作出率が得られた。

【0034】一方、共存培養温度を28℃とした場合は、アグロバクテリウム属の微生物の増殖が胚軸からの再分化に大きく影響を及ぼした。感染率の増加に伴い、褐変枯死する胚軸の数が急増し、得られるカナマイシン耐性カレスとシート数は減少する傾向が見られた。

【0035】以上のように、共存培養温度を高くした場合には遺伝子導入率は向上するが、再分化率が低下するため、最終的な作出率はあまりよくない。逆に共存培養温度を低くした場合には再分化率は向上するが、遺伝子導入率が低下し、やはり作出率はあまりよくない。そこで、共存培養温度のほか、遺伝子導入率及び再分化率に影響を与える、感染液への浸漬時間及び共存培養期間の3つのパラメーターの和を一定の範囲内に設定することにより、作出率を向上させることができると考えられる。但し、浸漬時間は遺伝子導入率及び再分化率に与える影響が最も少ないので10で割り、また、培養温度は

他のパラメータの比べ変化の割合が小さいので、アグロバクテリウム属の微生物の増殖が低下する19℃からの上昇温度とするため19で引き、さらに2乗することにし、下記の式を設定した。

【0036】浸漬時間[分] / 10 + (培養温度[℃] - 19)² + 培養期間(時) 表3が示すようにこの式値が82より大きく、145より小さい場合に、形質転換植物の作出効率が高くなる。

【0037】〔実施例1〕*B. rapa ssp. chinensis*の一品種「おそめ」(タキイ種苗(株))の種子を70%エタノールに2分間浸漬し、その後、Tween 20を1滴添加した1%の次亜塩素酸ナトリウム溶液で15-20分間滅菌し、滅菌水で3回洗浄した。滅菌操作が終わった種子は、播種培地の入ったアグリポットに15粒ずつ播種し、25℃、45-55μE、16時間日長下で6-7日間育成した。

【0038】播種後6-7日目の4-5cmに育った実生から5-10mmの胚軸を切り出し、組織片培養培地に並べた(胚軸 50本/シャーレ)。予め、組織片培養培地には、4日前に継代したタバコ(BY-2)の懸濁培養液を1.5mlを分注し、その上に滅菌ろ紙を敷いておいた。シャーレ(9cm)は、サージカルテープ(3M

社: Micropore) でシールし、25°C、暗黒下で24時間前培養した。

【0039】アグロバクテリウムEHA101(pIG121Hm) グリセロールストックからYBE培地に移し、28°C、3日間、インキュベートした。アグロバクテリウムEHA101の單一コロニーをカナマイシン及びハイグロマイシンを含むYBE液体培地 (Km 50mg/L, Hyg 50mg/L) に懸濁し、濁度がOD<sub>680</sub> = 1.0になるまで、28°C, 200rpm、18-24時間振盪培養した。pHを5.2に調整した組織片培養培地を13.5mLを分注した9cmシャーレに、前記微生物懸濁液1.5mLを加え、感染液を作成した。感染液に胚軸を浸漬させ (200本/シャーレ)、室温、40rpm、30分間振盪した。ピペットマンで感染液を吸い取った後、滅菌キムタオルに胚軸を移し、余分な感染液を除いた。胚軸を組織片培養培地に戻し、シャーレをパラフィルムでシールし、25°C、暗所、3日間、共存培養した。

【0040】共存培養後、アグロバクテリウム属の微生物の除菌のためカルベニシリン500mg/Lを含むカルス誘導培地に胚軸を移植した (40胚軸/シャーレ)。以後、シャーレはサージカルテープでシールした。25°C、45-55μE、16時間日長下で7日間培養した。

【0041】胚軸をカルベニシリン500mg/L、カナマイシン10mg/Lを含む不定芽形成培地に移植し (30胚

軸/シャーレ)、25°C、45-55μE、16時間日長下で2週間培養した。不定芽が形成されるまで胚軸をカルベニシリン500mg/L、カナマイシン10mg/Lを含む不定芽形成培地に2週間ごとに継代を繰り返した。約6-8週間でカナマイシン耐性シュートが形成された。

【0042】得られたカナマイシン耐性シュートをカルベニシリン500mg/L、カナマイシン50mg/Lを含む不定芽成熟培地に移植した。25°C、45-55μE、16時間日長下で3-4週間培養した。カナマイシン耐性遺伝子の導入されていないシュートは白く色が抜ける。

【0043】成熟したカナマイシン耐性シュートをカルベニシリン250mg/L、カナマイシン50mg/Lを含む発根培地を入れたアグリポットに移植し、発根を誘導した。25°C、45-55μE、16時間日長下で3-4週間培養した。十分発根した幼植物をポット (バーミキュライト: 育苗培土1:1) に移植する。滅菌水を十分にかけて、ビニール袋を掛けておいた。20°C、45-55μE、12時間日長下で育成させた。徐々にビニール袋に穴をあけて馴化させた。

【0044】〔実施例2〕実施例1と同様の方法で、ツケナ品種友好菜、紅菜苔、カブ品種本紅大丸カブ、日野菜カブについて遺伝子導入植物を作出した。各品種の作出率等を表4に示す。

#### 【0045】

【表4】

品種	供試数	KmRカルス SRM	KmRシュート SMM RIM		GUS+植物	作出率
			SMM	RIM		
友好菜	200	120	8	6	3	1
紅菜苔	200	83	4	3	2	0.5
本紅大丸カブ	200	98	13	5	1	0.5
日野菜カブ	200	63	5	4	2	0

KmRカルス: カナマイシン耐性カルス数  
KmRシュート: カナマイシン耐性シュート数  
GUS+植物: GUS活性陽性植物数  
SRM: 不定芽形成培地  
SMM: 不定芽成熟培地  
RIM: 発根培地

【0046】〔参考例1〕GUS遺伝子をプローブとしたサザンプロット解析により、形質転換体における導入GUS遺伝子及び導入遺伝子数を調べた。実施例1で得られたコマツナ品種「おそめ」の6個体から葉を採取し、これからMurray and thompson(1980) Nuc1. Acids Res. 8:4321-4325記載の方法によりDNAを抽出した。次いで、DNAを、制限酵素BamHI又はHindIIIで処理し、GUS遺伝子をプローブとしてサザンハイブリダイゼーションを行った。

【0047】BamHIで処理した場合を図2に、HindIIIで処理した場合を図3にそれぞれ示す。図中のCは非形質転換体の「おそめ」(コントロール)を示し、1-6は形質転換体の「おそめ」の個体番号を示す。図2が示すように、供試した6個体すべてにGUS遺伝子断片(4.0kb)が組み込まれていることを確認できた。また、図3が示すように組み込まれた遺伝子数は1-3で個体に

よって様々であった。これらの形質転換体は正常な生育を示し、形態的にも種子由来の対照品種と同様であった(図4)。また、花粉稔性も正常で自殖種子を得ることができた。

【0048】〔参考例2〕アグロバクテリウム属の微生物はナス科、ウリ科の植物では高い遺伝子導入率を示すが、アブラナ科植物に対しては一般的に低いので、宿主範囲の広いアグロバクテリウムの系統を使用が望まれる。そこで、5系統のアグロバクテリウム属の微生物を用いて遺伝子導入率を調べた。試験例1と同様の胚軸を、フィーダーセル(タバコ〔BY-2〕)を添加し、pHを5.2に調整した組織片培養培地に置床し、1日間前培養した。

【0049】一方、LBA4404(pLBA4404)、C58C1Rif(pM90)、C58C1Rif(pGV2260)、CIB542/A136(pCIB542)、EHA101 (pEHA101)の5系統のアグロバクテリウム属の

微生物をYBE液体培地で一晩培養し、得られた培養液を組織片培養培地で10倍に希釈し、感染液を調製した。これら5種類の感染液に、前培養後の胚軸を10分間浸漬し、再び組織片培養培地に戻し、25°Cで2日間

共存培養した。共存培養後の胚軸GUS活性を試験例1と同様に調べた。結果を表5に示す。

#### 【0050】

【表5】

系統	供試数	GUS活性			導入率 +total (%)
		++	+	-	
LBA4404(pLBA4404)	100	0	0	100	0
C58C1Rif(pM90)	100	6	30	64	42
C58C1Rif(pGV2260)	100	14	38	48	66
CIB542/A136(pCIB542)	100	24	42	34	90
EHA101(pEHA101)	100	23	51	26	97
					48.5

【0051】表2が示すように、CIB542/A136、EHA101は、それぞれ45%、48.5%の高い遺伝子導入率を示した。これらの系統は共にアグロバクテリウム野生株A281に由来するTiプラスミドを有する系統であり、広い宿主範囲を示す。なお、ナス科、ウリ科で一般的に用いられるLBA4404では感染は認められなかった。

#### 【0052】

【発明の効果】本発明は、アグロバクテリウム属の微生物を用いて、効率的にブラシカ属の植物に遺伝子を導入

し、形質転換植物を作出する方法を提供する。

#### 【図面の簡単な説明】

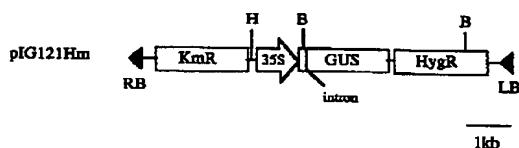
【図1】バイナリーベクターpIG121HmのT-DNA領域を示す図

【図2】BamHIで処理したDNAのサザンプロットティングの結果を示す図

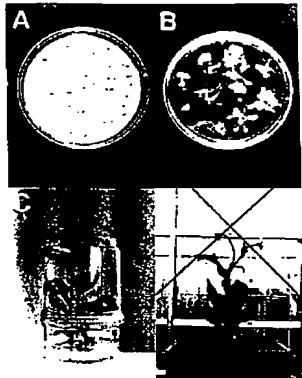
【図3】HindIIIで処理したDNAのサザンプロットティングの結果を示す図

【図4】形質転換植物の生物の形態を示す写真

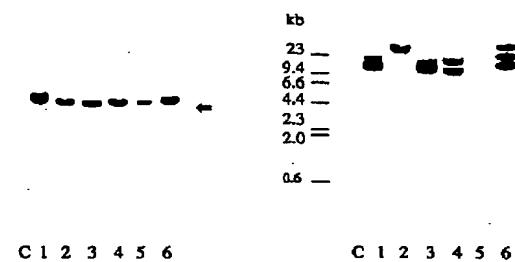
【図1】



【図4】



【図2】



【図3】



胚軸を用いたブラシカ・ラバ(おそめ)の形質転換系

- A 共存培養
- B カナマイシンによる選抜
- C カナマイシン耐性ショートの発根
- D 開花時の遺伝子導入個体